



19
209

Universidad Nacional Autónoma
de México



Facultad de Estudios Superiores
CUAUTITLÁN

**Estandarización de la prueba de aglutinación con
partículas de látex para el diagnóstico de antígeno
circulante en infecciones por *Candida albicans*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
JUDITH CHAPARRO ROCHA

Asesor: Ph. D. Roberto Arnulfo Cervantes Olivares

Coasesor: M.V.Z. Enrique Salas Téllez

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| Resumen | 1 |
| 1.0 Introducción | 2 |
| 1.1 -Generalidades de <u>Candida albicans</u> | 2 |
| 1.2 -Mecanismos de patogenicidad | 10 |
| 1.3 -Infecciones causadas por <u>Candida albicans</u> en el humano | 17 |
| 1.4 -Diagnóstico de <u>Candida albicans</u> | 19 |
| 2.0 Objetivos | |
| 3.0 Materiales y Métodos | 23 |
| 4.0 Resultados | 31 |
| 5.0 Discusión | 41 |
| 6.0 Conclusión | 48 |
| 7.0 Referencias | 55 |
| Apéndice | 49 |

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

| | | |
|-----------------|---|-----------|
| Figura 1 | Levadura. Corte esquemático | 4 |
| Figura 2 | Pared celular de <u>Candida albicans</u> | 6 |
| Figura 3 | Manoproteína | 9 |
| Cuadro 1 | Titulación en cuadrícula. Esquema | 27 |
| Figura 4 | Grado de aglutinación en placa | 29 |
| Cuadro 2 | Resultados de la valoración de carbohidratos en las mananas extraídas | 31 |
| Figura 5 | Determinación de carbohidratos. Curva patrón | 32 |
| Figura 6 | Espectro de infrarrojo de mananas estandar | 33 |
| Figura 7 | Espectro de infrarrojo de mananas extraídas | 34 |
| Cuadro 3 | Resultados de la producción de anticuerpos | 35 |
| Cuadro 4 | Titulación en cuadrícula. Resultados en suero hiperinmune | 36 |
| Cuadro 5 | Titulación en cuadrícula. Resultados en solución de IgG | 37 |
| Cuadro 6 | Titulación en cuadrícula. Resultados en testigo negativo | 38 |
| Cuadro 7 | Resultados de la prueba de aglutinación en placa con partículas de látex | 39 |
| Cuadro 8 | Resultados de pruebas cruzadas | 40 |

RESUMEN

Se realizó la estandarización de la prueba de aglutinación con partículas de látex para el diagnóstico de infecciones sistémicas causadas por Candida albicans. Se extrajo la manana de la pared celular de esta levadura por medio de hidrólisis alcalina y precipitación con solución de Fehling, y se le efectuaron análisis de calidad y pureza. Se produjo anticuerpos contra la manana de la pared celular de Candida albicans en conejos Nueva Zelanda hasta obtener un título de aglutinación en placa con células completas de 1:1024. Este suero obtenido se utilizó para recubrir partículas de látex y utilizarlas en la detección de mananas solubles. Como control negativo se utilizó partículas de látex sensibilizadas con suero hiperinmune anti Dermatophilus congolensis, que es un organismo no relacionado con Candida albicans. La mínima concentración de mananas solubles detectada por esta técnica fué de 15 µg/ml.

1.0 INTRODUCCIÓN.

1.1 GENERALIDADES DE Candida albicans.

Candida albicans es un hongo dimórfico que como levadura se considera comensal del tracto gastrointestinal de individuos sanos, pero es también probablemente el hongo patógeno más importante. (2)

Candida albicans pertenece al:

| | |
|----------|--------------------------------------|
| REINO: | Fungi u hongo |
| PHYLUM: | Deuteromycota o fungi "imperfect" |
| CLASE: | Blastomycetes |
| FAMILIA: | Cryptococcaceae |
| GENERO: | Candida |

El género Candida se encuentra formado por hongos que presentan la forma unicelular (levadura) como fase predominante y por algunas especies que pueden llegar a presentar una fase pluricelular (micelio verdadero), pasando por una etapa intermedia denominada tubo germinativo (10).

Las levaduras son células de forma oval Gram positivas, que miden de 2 a 8 μm por 2.5 a 20 μm dependiendo de la especie. Son organismos aeróbicos que presentan división por gemación (10).

Las principales características de las 81 especies actualmente agrupadas bajo el género Candida son: La habilidad para producir pseudohifa o pseudomicelio (que son cadenas de blastosporas elongadas que dan apariencia de un micelio) en ciertos medios de cultivo, y la capacidad de desarrollar ascosporas. Candida albicans no solo puede presentarse como blastospora y pseudohifa, sino también como una hifa

verdadera con formación de clamidosporas (39).

Hace casi tres décadas, Hasenclever y Mitchell desarrollaron un método para la serotipificación de Candida albicans. En base a antígenos de superficie no definidos aún, este método define dos serogrupos principales, el A y el B (25,39).

Estudios independientes en los Estados Unidos y en Europa realizados entre 1961 y 1981 mostraron que el serotipo prevalente en el aislamiento de pacientes con infecciones causadas por Candida albicans era el tipo A (65-95%). Estudios más recientes realizados en Estados Unidos, Europa y Africa muestran que hay un claro incremento en la prevalencia del serotipo B, sobre todo en pacientes con SIDA (7).

Estudios realizados en microscopio electrónico (1) han revelado que Candida albicans presenta una típica membrana de células eucarióticas. Figura 1

Los análisis de la composición química de la membrana muestran a las proteínas y a los lípidos como sus principales componentes con pequeñas cantidades de carbohidratos y ácidos nucleicos (39).

La membrana es de particular importancia en el control homeostático y en la susceptibilidad a los agentes micóticos de este hongo. También se ha confirmado su importancia en la síntesis de las capas de la pared celular y en la expresión de los antígenos de superficie (34)

Por otro lado, a pesar de las profundas diferencias químicas, estructurales y funcionales existentes entre la membrana y la pared celular de Candida albicans, se han podido encontrar ciertos epítopes

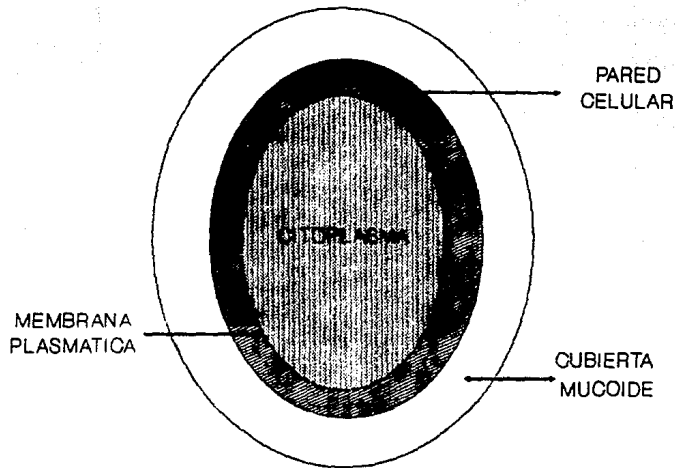


Figura 1. LEVADURA. CORTE ESQUEMATICO
Obtenido de referencia (1)

compartidos por ambas estructuras a diferentes tiempos de crecimiento, tanto en la blastoconidia como en el tubo germinativo (34).

La pared celular presenta tres funciones principales: mantiene la forma celular, secreta las enzimas hidrolíticas y es el punto de contacto entre el hongo y su medio. Estas funciones son de suma importancia en la patogénesis y en el serodiagnóstico de Candida albicans por lo que se explica el esfuerzo prestado a su estudio (34).

La pared celular de Candida albicans se encuentra formada por múltiples capas según se puede observar en la Figura 2 (9).

En general, las investigaciones concuerdan en que la pared de Candida albicans se compone principalmente de los polisacáridos glucana y manana, con cantidades menores de quitina, proteínas y lípidos. Las glucanas y las mananas frecuentemente se encuentran combinadas con proteínas en porciones de la pared celular formando glucoproteínas, manoproteínas y glucomanoproteínas (39).

A pesar de que la síntesis de los componentes de la pared se ve influenciada tanto por las condiciones de crecimiento y el estado metabólico del hongo como por el estado inmunológico del hospedador (19), investigadores como Calderone (9) reportan datos consistentes en cuanto a la composición porcentual (en peso seco) de la pared celular de Candida albicans.

| | |
|-----------------|--------------|
| MANANAS | 15.2 - 22.9% |
| GLUCANAS | 47 - 60% |
| PROTEINAS | 6 - 25% |
| LIPIDOS | 1 - 7% |
| QUITINA | 0.6 - 9% |

Candida albicans

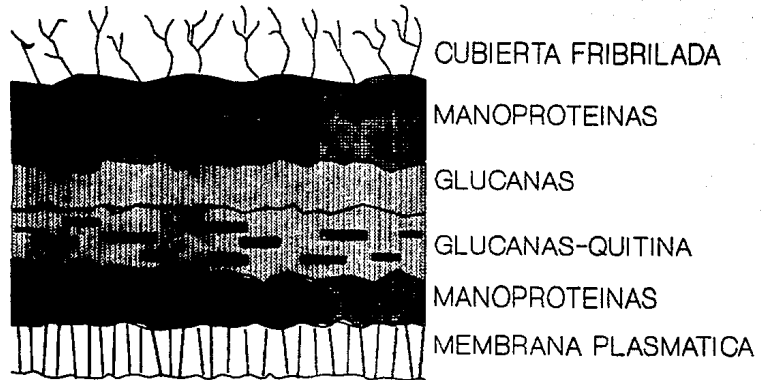


Figura 2. PARED CELULAR DE *Candida albicans*
Obtenido de referencia (9)

Las composiciones de la pared celular de la levadura y de la hifa son relativamente semejantes (9). Sin embargo, las diferencias tanto cualitativas como cuantitativas existentes entre estas dos formas de crecimiento han sido ampliamente discutidas (2,39,51).

En general, los investigadores concuerdan en que las capas internas de la pared celular se componen en su mayoría de quitina y glucanas, las cuales proporcionan rigidez a la vez que intervienen en forma esencial durante la división celular. Se conocen tres tipos de β -glucanas: β -1,6-glucanas altamente ramificadas, β -1,3-glucanas altamente ramificadas y una mezcla de β -1,3- β -1,6-glucanas conjugadas con quitina. Las proporciones en que aparecen las diferentes glucanas varía entre las formas de levadura y de tubo germinal de Candida albicans (9).

Con lo que respecta a los lípidos, se ha logrado determinar la naturaleza de los mismos por medio de un análisis de Marriott y otras técnicas de extracción de lípidos. Encontrándose ésteres de esterol, principalmente de zimosterol, triglicéridos y ácidos grasos de 16 a 18 Carbonos de longitud de cadena, y esteroles libres, principalmente el ergosterol. También se ha demostrado, que la composición lipídica de la pared varía según las condiciones químicas del medio ambiente y del tipo de cepa de Candida albicans en cuestión (36).

De todos los componentes de la pared celular, probablemente el de mayor relevancia en el serodiagnóstico de Candida albicans sean las manoproteínas, y en especial las mananas por sus características químicas y antigénicas. Según se puede ver en la Figura 2, las

manoproteínas se encuentran distribuidas a través de la pared celular principalmente en zonas de alta densidad electrónica y en la cubierta fibrilada (9).

En la figura 3 se esquematiza la manoproteína de la pared celular de Candida albicans. El modelo estructural señala que el oligosacárido se encuentra unido covalentemente a la proteína ya sea como pequeños oligosacáridos (unidos por enlaces tipo O, vía residuos de treonina o serina) o como un complejo oligosacárido mayor unido por enlaces N que involucran dos unidades de N-acetil-D-glucosamina y residuos de asparagina (9). Por lo que respecta a la manana, se ha demostrado que contiene principalmente residuos de manopiranososa unidos por enlaces $\alpha(1-6)$ y $\alpha(1-2)$. Los residuos de manosa unidos por enlaces $\alpha(1-6)$ forman una cadena que esta altamente sustituida por cadenas cortas de oligomanósidos que contienen uniones internas $\alpha(1-2)$ y en menor cantidad uniones $\alpha(1-3)$.

Aunque aún no se conoce con precisión las estructuras que funcionan como inmunodeterminantes específicos si se sabe que las cadenas laterales de las mananas contienen los epítopes que confieren la seroespecificidad; sobre todo al provocar cambios fenotípicos en la superficie de la pared (causados por diferentes arreglos en las manoproteínas expresadas) (36).

En base a numerosas investigaciones realizadas en levaduras e hifas de Candida albicans se observa que su composición de mananas es diferente (19). En general, la diferencia consiste en un decremento en la longitud promedio de la cadena de mano-oligosacáridos en las mananas de las hifas en comparación con las de la levadura. Se

Candida albicans

cadena externa variable

(manosa/fosfato)

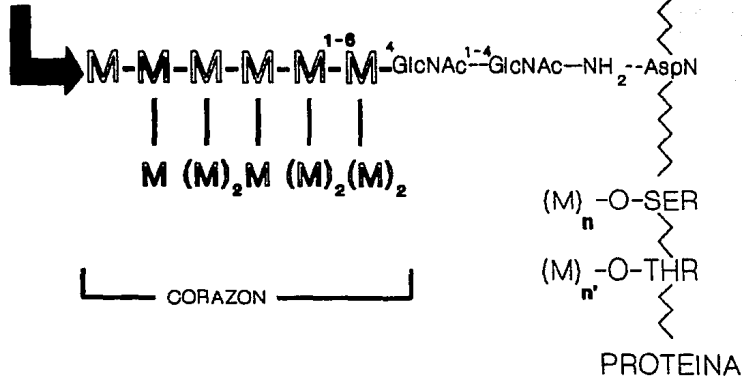


Figura 3. MANOPROTEINA. Obtenido de referencia (9)

atribuye dicho decremento a una menor actividad de la enzima manosil transferasa en la forma de hifa que en la de levadura (46,51).

1.2 MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE Candida albicans.

Son numerosos los estudios hechos para definir los mecanismos patogénicos de Candida albicans el cual es un parásito sumamente complejo que se presenta frente al hospedador con varios factores de virulencia que le permiten causar enfermedad (9).

La variabilidad genética entre las cepas de Candida albicans puede dar lugar a diferentes propiedades de virulencia, y puede explicar porqué a pesar de la intensa investigación realizada, no se llega a un acuerdo sobre el carácter de Candida albicans que determina el factor de virulencia (13).

Estudios publicados por investigadores estadounidenses (48) en los que se aplicaron métodos de tipificación por DNA concluyen que los diversos sitios corporales, en un sólo individuo, colonizados o infectados con Candida albicans presentan generalmente un mismo patrón de DNA, lo que significa que hubo una transición de la forma comensal a la forma infectante que se distribuyó a diferentes tejidos. También concluyen que Candida albicans puede activar diferentes fenotipos en el curso de la transición de comensal a invasor.

Tal vez, uno de los aspectos de la interacción Candida albicans -hospedador que más atención ha recibido en relación a la virulencia es la capacidad de este hongo de llevar a cabo una transformación de levadura a hifa. A diferencia de otros hongos dimórficos en los que

la fase levaduriforme es la forma infectante que difiere completamente de la forma de vida libre, en las lesiones por Candida albicans se pueden presentar las formas de levadura y las de hifa (hifa verdadera y pseudohifa) a la vez (39).

Uno de los primeros investigadores en reportar las interacciones entre levaduras o hifas y células del hospedador fué Young en 1958. Young notó la habilidad de las hifas para penetrar las células mononucleares del hospedador. Él concluyó que la hifa era la forma infectante debido a su capacidad de evitar la fagocitosis. Sin embargo, estudios posteriores de Diamond y col. señalan que no es necesaria la ingestión por los neutrófilos para matar las hifas y pseudohifas de Candida albicans. Al parecer, el tubo germinal por sí mismo no provee al hongo de un mecanismo de resistencia a los neutrófilos; e incluso, pudiera ser más vulnerable esta forma que la de levadura (13).

Otro factor estudiado con relación a la virulencia es la producción de enzimas líticas por Candida albicans. Se reconoce que los hongos patógenos pueden secretar varias enzimas hidrolíticas como proteasas y fosfolipasas al medio. Estas enzimas secretadas al medio pueden jugar un papel importante en la infección al causar daño a las células del hospedador. Las proteasas secretadas por algunas cepas de Candida albicans han sido estudiadas y se considera como un factor de virulencia la capacidad que tiene de secretar proteasas ácidas (49).

Reportes recientes han informado del aislamiento de tres enzimas que pudieran jugar un papel importante en la patogenicidad de Candida

albicans: La fosfolipasa A, la lisofosfolipasa y la lisofosfolipasa transilasa. Se supone que la primera daña las membranas celulares del hospedador, mientras que la segunda protege a la levadura del efecto lítico de su propia fosfolipasa, pero el papel fisiológico de la última enzima aún es desconocido. Investigaciones posteriores, también demostraron que la actividad de la fosfolipasa de Candida albicans tiene correlación con la adherencia celular y la mortalidad en ratones (25,50).

Para explicar el papel que tiene la proteasa en la adherencia de Candida albicans se han manejado las siguientes hipótesis:

- a) La proteasa se localiza en la superficie de Candida albicans y al igual que una manoproteína funciona como puente para el ataque hacia las células del hospedador.
- b) La proteasa modifica la superficie celular de Candida albicans de forma que promueve el ataque sobre las células del hospedador.
- c) La proteasa modifica las membranas celulares del hospedador para que permitan el ataque del hongo (13).

Una mutante de Candida albicans no productora de fosfolipasa descrita por Kwon-Chung y col. (32) resultó ser avirulenta para ratones, lo que parece evidenciar el importante papel que juega este factor en la patogenia de la levadura (9). Sin embargo, se piensa que la enzima no actúa como un factor de virulencia por sí sola, sino que ayuda a la propagación del hongo en el hospedador. Dentro del papel que juega esta enzima en la patogenia se incluye también el ataque a los anticuerpos, granulocitos y macrófagos y la aportación de nutrientes a la levadura por medio de la digestión de proteínas (23).

Numerosos reportes señalan la presencia de una enzima de 47 kDa (11,17,53) presente tanto en el citoplasma como en la pared celular de las formas miceliales y de levadura de Candida albicans, se descubrió por medio de un mapeo de péptidos que su estructura antigénica se conservaba intacta en diferentes cepas de Candida albicans.

A partir del análisis de su secuencia de aminoácidos, de su actividad, de su localización y de su peso molecular, se logró demostrar que se trata de la enzima glicolítica enolasa. (11,17,27) Debido a que esta enzima se ha encontrado circulando en la sangre de pacientes con infección sistémica por Candida albicans, se ha prestado gran atención al uso de esta enzima como marcador antigénico para el desarrollo de una prueba de detección de anticuerpos específicos, que mejore el serodiagnóstico de estas infecciones (53). Por otra parte, es generalmente reconocida la importancia de la adherencia como factor de virulencia dependiendo del sitio al cual se adhiere y coloniza. Investigadores estadounidenses (9) clasificaron las adhesinas de Candida albicans en tres grandes categorías: La primera comprende a las moléculas involucradas en la interacción entre la porción proteica de las manoproteínas de la levadura y la porción proteica de las glicoproteínas del hospedador. La segunda categoría incluye a las moléculas involucradas en la actividad de reconocimiento en la cual la fracción proteica de la superficie de Candida albicans reconoce a las moléculas de azúcares de las glicoproteínas de la membrana celular del hospedador. Por último, la tercera categoría abarca la porción carbohidratada de una molécula

(llamada frecuentemente factor 6 de Candida albicans) y un receptor de membrana del hospedador aún desconocido. Cutler sugiere por su parte, una cuarta categoría en la que incluye las interacciones hidrofóbicas entre las proteínas de superficie celular de Candida albicans y un receptor desconocido del hospedador (13).

Finalmente se puede concluir que la importancia de la adherencia en la interacción Candida albicans - hospedador depende probablemente de las características propias de virulencia de la cepa involucrada (genotipo), del sitio tisular de interacción y del estado inmunológico del hospedador (13).

Un factor más que se ha visto involucrado en la virulencia de Candida albicans es la capacidad que esta tiene para modular la respuesta inmune del hospedador en forma positiva y negativa. Las responsables de dicha actividad son las mananas de la pared celular. Se han reportado numerosos trabajos en los que se señala que las mananas se encuentran frecuentemente unidas a anticuerpos formando complejos inmunes solubles, los cuales son capaces de iniciar un proceso inflamatorio al atraer el complemento y las células polimorfonucleares. También se ha demostrado que las mananas por sí solas son capaces de activar la vía alterna del complemento y suprimir la respuesta inmune celular (41). En experimentos realizados en 1974 (43) se señala que las glucomanoproteínas provocan una respuesta cutánea más marcada y duradera que la provocada por mananas solas. Esto puede deberse a la ausencia de glucosa en las mananas o posiblemente a otro tipo de enlace presente en la manana que permanece unido a la glucana insoluble de la pared celular.

Debido a la creciente importancia clínica de Candida albicans, es necesario comprender mejor las relaciones entre este parásito y el sistema de defensa del hospedador.

Se sabe, basandose en tipificación epidemiológica con DNA, que la mayoría de las infecciones causadas por Candida albicans son de origen endógeno (48); por lo que la primera relación hospedador-hongo se da a nivel mucocutáneo. Normalmente Candida no crece en la piel debido a múltiples sustancias inhibitorias de su proliferación que contiene la piel sana (21). En el mismo sentido, la proliferación de este hongo en el tracto gastrointestinal está controlada por varios factores como son: la flora aeróbica y anaeróbica normal del tracto gastrointestinal, la acidez gástrica normal, la mucosa local y la defensa inmunológica del hospedador (45).

El sistema inmune celular juega un papel importante en el control de la proliferación de Candida albicans. Es claro que las células fagocíticas son de suma trascendencia en la defensa del hospedador contra la diseminación del hongo por la sangre. Se reconoce que las células fagocíticas mononucleares y los leucocitos polimorfonucleares son capaces de fagocitar a la levadura (aunque ambas células son susceptibles a sufrir daño por parte de las levaduras ingeridas) y de causarle muerte por sistemas intra y extracelulares como son los mecanismos oxidativos y no oxidativos, enzimas lisosomales, defensinas, etc. (21).

Se ha logrado demostrar que un sistema inmune celular deprimido incrementa la susceptibilidad en el humano a sufrir infecciones por Candida albicans, sobre todo en pacientes con deficiencia de células

T; por lo que se podría asegurar que el control de la colonización en superficies mucocutáneas depende en gran medida de los linfocitos T y/o de sus productos. La evidencia señala que los linfocitos T mejoran el proceso de recuperación de una infección sistémica primaria, pero falta por elucidar la naturaleza precisa de sus mecanismos efectores (2). Es importante señalar que en individuos con función deficiente de células T, generalmente no se presentan infecciones diseminadas por la sangre; por lo que al parecer otro sistema de defensa del hospedador aparte del mediado por células debe ser responsable de prevenir la infección sistémica (8).

Al parecer, un factor sérico (que no es el Complemento ni las inmunoglobulinas) tiene un efecto inhibitorio para Candida albicans al aglutinar las levaduras, pero su significado real no se conoce todavía (21). En literatura reciente se reporta que la proteína C reactiva puede ser este factor desconocido debido a su capacidad para aglutinar y precipitar numerosos sustratos de manera no específica; su presencia provoca un aumento de la resistencia del paciente contra Candida albicans, Salmonella typhimurium, Listeria monocytogenes y Yersinia pestis entre otros microorganismos (3).

Se reconoce que los componentes de la pared celular de Candida albicans activan la vía alterna del Complemento y que esta vía es de vital importancia en el aumento de la fagocitosis (21). Sin embargo, algunos investigadores (9) han logrado caracterizar los receptores iC3b y C3d en Candida albicans y sostienen que dichas moléculas actúan como cofactores en la degradación enzimática del Complemento, por lo tanto permite al microorganismo resistir la opsonización,

promueve la aglutinación a través de las interacciones Complemento-Complemento fijado al receptor, compite con los receptores del fagocito del hospedador por los ligandos, con lo que reduce la eficiencia de la fagocitosis y le permite a Candida albicans evadir la identificación del fagocito por medio de una mimetización molecular.

Otro factor que puede tener la responsabilidad de prevenir la infección sistémica es el sistema inmune humoral, el cual al parecer, puede funcionar tanto opsonizando al hongo como también facilitando la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (2). Se sabe que los polisacáridos tienden a producir una respuesta de inmunoglobulinas más intensa que las proteínas, sin embargo, también las proteínas y glicoproteínas pueden ser factores antigénicos importantes (25).

1.3 INFECCIONES CAUSADAS POR Candida albicans EN EL HUMANO.

Candida albicans es un hongo dimórfico comensal de los seres humanos sanos, pero que se vuelve invasor cuando algún aspecto de la inmunología del hospedador sufre una merma (7).

Debido a que es un organismo que virtualmente se encuentra presente en todos los seres humanos desde su nacimiento, está en una posición ideal para tomar ventaja de cualquier debilidad de su hospedador y provocar un aumento en su colonización que origine una infección a otros órganos (8).

Los factores predisponentes más importantes para que ocurra la transformación de Candida albicans de una levadura comensal a una

patógena son: El uso de una terapia prolongada con antibióticos que altere la flora normal del tracto gastrointestinal, la presencia de enfermedades concomitantes, procesos quirúrgicos, obesidad, drogadicción, quimioterapia contra el cáncer e irradiación que resulten en un decremento en la defensa inmunitaria del hospedador, tratamientos con corticosteroides, terapia con fármacos inmunosupresores y cateterización intravenosa (8,39).

Las infecciones originadas por Candida albicans pueden manifestarse en diferentes grados de severidad, desde un problema superficial de la piel, una infección crónica de las uñas, una enfermedad de la cavidad oral, garganta o vagina hasta una infección sistémica frecuentemente fatal que involucra órganos como pulmones, corazón y riñones (25).

Las formas más comunes son las infecciones superficiales de las membranas mucosas oral y vaginal, que son una causa de morbilidad significativa tanto en niños como en mujeres adultas. Cerca de un 5% de los recién nacidos sanos desarrollan infección oral y probablemente un 75% de las mujeres adultas sufren de infección vaginal por Candida albicans al menos una vez durante su vida reproductiva. Las infecciones esofágicas y orales se presentan más frecuentemente en pacientes infectados con HIV y en pacientes con SIDA (2,8,12,41).

Las infecciones sistémicas se presentan cada vez más frecuentemente en pacientes hospitalizados por tiempo prolongado, principalmente en aquellos que se encuentran bajo tratamiento citotóxico o inmunosupresor y son responsables de un índice de mortalidad

significativo. Del 79 al 81% de los pacientes con infección sistémica mueren; es de notar que la mortalidad permanece elevada a pesar de tratamientos con antimicóticos como la anfotericina B (6,24).

Existen diferencias en las definiciones de candidemia, infección por Candida sistémica e infección por Candida invasiva focal. En general, se define a la candidemia como uno o más hemocultivos positivos a Candida spp. y una temperatura oral igual o mayor a 38°C . La infección sistémica se define como la evidencia histológica de la invasión a tejidos por Candida spp. en dos o más víceras. La infección invasiva focal se presenta como la evidencia histológica de invasión a un órgano (el hígado por ejemplo) o la presencia de un síndrome fuertemente sugerente de una infección invasiva que involucre un órgano (endoftalmitis por ejemplo) (40).

1.4 DIAGNÓSTICO DE Candida albicans.

Es debido al incremento en las infecciones causadas por Candida albicans que su diagnóstico temprano y preciso se ve como una necesidad cada vez más importante.

Los métodos actuales utilizados en el laboratorio clínico para la identificación de este hongo se basan principalmente en la prueba del tubo germinal, la producción de clamidosporas y la habilidad del hongo para utilizar azúcares. La identificación total del hongo por los dos últimos métodos toma de dos a tres días por lo que la primera prueba (en la que se ve la capacidad de la levadura para formar un tubo germinal o micelio en suero a 37°C) que se realiza en dos horas es muy popular. Sin embargo, las cepas de Candida albicans no

productoras de tubo germinal representan del 1 al 2% de las especies y en ocasiones, algunas formas parecidas al micelio pueden ser confundidas con el tubo germinal en otras especies diferentes a Candida albicans (14).

Además, se han investigado otras técnicas para mejorar el diagnóstico de esta levadura implementando nuevos medios de identificación y técnicas eficaces para su cultivo (20,26). Pero al parecer todas estas técnicas requieren de un tiempo considerable para su realización, que en algunos casos sobrepasa las 24 horas, haciéndolas poco prácticas en el laboratorio clínico.

Otro aspecto muy estudiado, es el diagnóstico de infecciones causadas por Candida albicans por medio de reacciones antígeno-anticuerpo, sobre todo en el caso de infecciones sistémicas.

En la actualidad, el diagnóstico de infección sistémica por Candida albicans es en primera instancia clínico, la confirmación definitiva es por la demostración histopatológica de invasión en tejido visceral y el diagnóstico en el laboratorio incluye en ocasiones la detección de anticuerpos o antígenos, pero se basa principalmente en la prueba de "lisis-centrifugación", es decir, en un hemocultivo positivo para la levadura; sin embargo este método presenta importantes inconvenientes como son el largo tiempo necesario para establecer el diagnóstico y su baja sensibilidad ya que solo detecta del 35 al 44% de los casos de infección diseminada (18,33).

Por lo tanto se ha hecho necesario desarrollar técnicas de diagnóstico inmunológicas; en primer lugar se trató de detectar los niveles de anticuerpos contra Candida albicans, pero debido a que en

los pacientes inmunocomprometidos o inmunosuprimidos los niveles de anticuerpos son muy bajos se decidió encaminar el diagnóstico a la detección de antígeno de Candida albicans; además, también se seleccionó esta opción debido a que los anticuerpos contra Candida albicans se encuentran presentes en el hombre en una muy alta generalidad sin que exista infección, esto es debido a que se entra en contacto con este organismo incluso desde el nacimiento (30,35).

En el diagnóstico de infección sistémica por Candida albicans, los métodos usados se basan en la detección de al menos dos clases de antígenos solubles, uno lábil al calor (proteína o glicoproteína) y otro estable (manana) (5,38).

En general, las pruebas diagnósticas basadas en la detección de mananas presenta mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de infección sistémica por Candida albicans, que las pruebas basadas en la detección de antígenos protéicos. (6,33,40,44)

Los métodos de serodiagnóstico que detectan niveles de mananas circulantes incluyen inmunoensayos enzimáticos con anticuerpos policlonales o monoclonales, radioinmunoensayos, coaglutinación y aglutinación con partículas de látex. Sin embargo, apesar de su valor clínico potencial pocos de estos métodos han sido aceptados para uso diagnóstico cotidiano. El problema reside principalmente en que aquellas pruebas más prometedoras requieran de procedimientos que resultan demasiado complicados para el análisis rápido de una sola muestra en un laboratorio de diagnóstico ordinario. Por esta razón, numerosos laboratorios enfocan su atención en las pruebas de aglutinación con partículas de látex (4,30,33,50).

2.0 OBJETIVOS.

2.1 OBJETIVO GENERAL.

El objetivo del presente trabajo es estandarizar la técnica de aglutinación con partículas de látex para efectuar el diagnóstico de infección sistémica causada por Candida albicans por medio de la detección de manana como antígeno circulante en suero.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

Extraer la manana de la pared celular de Candida albicans por medio de una hidrólisis alcalina.

Efectuar análisis de calidad y pureza a las mananas extraídas.

Producir anticuerpos antimananas en conejos Nueva Zelanda hasta obtener un título de aglutinación en placa de células completas de 1:1024.

Recubrir partículas de látex con los anticuerpos antimananas.

Determinar la mínima concentración de mananas solubles de Candida albicans detectada por las partículas de látex sensibilizadas.

Determinar las condiciones experimentales para la detección de mananas solubles por medio de la técnica de aglutinación con partículas de látex.

3.0 MATERIALES Y METODOS.

3.1 Producción de biomasa.

Se utilizó una cepa de Candida albicans donada por el laboratorio de Micología de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. Se realizó la prueba de API - 20C (Merck) para confirmar el género y la especie de la cepa utilizada. Apartir de un tubo de Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) sembrado con Candida albicans con 24 horas de crecimiento se preparó un inóculo resuspendiendo las levaduras en 5 ml de solución salina fisiológica (SSF). Esta suspensión de Candida albicans se inoculó en 100 ml de Caldo Dextrosa Sabouraud, se dejó crecer por 24 horas a temperatura ambiente en agitación constante y se inocularon dos matraces de 1000 ml con la biomasa obtenida, estos segundos inóculos se dejaron crecer por 72 horas a temperatura ambiente y en agitación constante, pasado este tiempo se inoculó un botellón que contenía 12 litros de Caldo Dextrosa Sabouraud, se dejó a temperatura ambiente en un agitador orbital a 160 r.p.m. por 48 horas. Pasado ese tiempo se concentraron las células mediante centrifugación a 1910xg por 30 minutos y se lavaron 2 veces con solución SSF estéril.

3.2 Extracción de mananas.

Se siguió la técnica descrita por Valdespino (52). La biomasa concentrada obtenida se hidrolizó con NaOH al 6% de concentración

final a 80°C durante 3 horas, se centrifugó a 5600-7600xg durante 15 minutos, se ajustó el sobrenadante a pH 5.0 con ácido acético glacial, se volvió a centrifugar a 5600-7600xg por 15 minutos y al sobrenadante se le agregó solución de Fehling (vol./vol.), nuevamente se centrifugó y la pastilla obtenida se resuspendió con HCl 3N y se precipitó con metanol frío, el precipitado obtenido se lavó con acetona 3 veces. Se dejó evaporar la acetona y se resuspendieron las mananas en agua destilada, obteniéndose de esta forma una suspensión de mananas no solubles. Debido a la necesidad de solubilizar las mananas para su uso posterior, se siguió la técnica modificada de Pike et al (15,42). Según la cual 1 ml de muestra se mezcla con 0.4 ml de Buffer Salino de Glicina 0.1 M (pH 7.4) conteniendo E.D.T.A. 0.1 M, la mezcla se hierve por 5 minutos. Posteriormente se centrifuga a 1910xg por 20 minutos y se conserva el sobrenadante a -20°C hasta que se realice la cuantificación de mananas.

3.3 Evaluación de manoproteínas.

Para valorar la calidad y cantidad de las mananas obtenidas se cuantificó su contenido de carbohidratos por la técnica de Fenol/Ácido Sulfúrico (16,29) (Ver apéndice). El análisis de espectro de infrarrojo se realizó en pastilla de Bromuro de potasio, para evaluar la pureza de las mananas extraídas al compararlas con un patrón de mananas (SIGMA M-3640).

3.4 Producción de Suero Hiperinmune.

Se utilizaron conejos hembra raza Nueva Zelanda de 2.5 kg de peso aproximado con el siguiente protocolo de inoculación (4): Se inoculó 1 ml de células completas de Candida albicans inactivadas por calor a una concentración de 2×10^8 células/ml cinco veces por semana hasta que se obtuvo un título de aglutinación en placa de 1:1024. La prueba de aglutinación en placa se realizó a temperatura ambiente con rotación de 160 r.p.m. por 10 minutos. En una placa de aglutinación se colocaron 50 microlitros de suero y 50 microlitros de suspensión de células de Candida albicans al 2%, se mezclaron y se agitaron hasta leer el resultado; como control negativo se utilizó suero normal de conejo y como control positivo suero hiperinmune contra Candida albicans donado por el Laboratorio de Micología.

También se comprobaron los niveles de anticuerpos por medio de una prueba de doble difusión, utilizando como antígenos un sonicado de Candida albicans y las mananas obtenidas previamente (47,52). Ver apéndice.

Al obtenerse los títulos requeridos se sangró en blanco a los conejos por la vena marginal de la oreja con la ayuda de una bomba de vacío y por punción cardíaca (31).

Para obtener la fracción globulínica del suero hiperinmune contra Candida albicans se siguió el método de precipitación con sulfato de amonio (22). (Ver apéndice). Con el objeto de comprobar si existe diferencia entre las partículas de látex recubiertas con IgG antimanas y partículas de látex recubiertas con antisuero

antimananas, se fraccionó unicamente la mitad del total de suero obtenido, con esta fracción se recubrió un lote de las partículas de látex y otro lote se recubrió con la mitad del suero hiperinmune completo (30).

3.5 Sensibilización de partículas de látex.

Se emplearon esferas de poliestireno de 0.8 micrometros de diámetro para preparar las partículas control y las partículas sensibilizadas. Se ajustó una suspensión de partículas de látex a una D.O. de 0.3 a 650 nm en Buffer Salino de Glicina (NaCl 0.85% y Glicina 0.75%, pH 8.2) y se incubaron a 37°C por una hora con un volumen igual de suero o de solución de inmunoglobulina de conejo antimanana diluido 1:2. La dilución óptima del suero y de la solución de IgG se seleccionaron por titulaciones en cuadrícula con manana como antígeno. La esquematización de la titulación en cuadrícula se muestra en el Cuadro 1. Por medio de esta titulación en cuadrícula se determinó que dilución de suero y de solución de IgG se utilizaría para recubrir las partículas de látex; se escogió la mayor dilución que diera las partículas de látex más sensibles, es decir, aquellas partículas de látex sensibilizadas que detectaran adecuadamente la menor cantidad de antígeno posible.

Pasada la hora de incubación, se centrifugaron las partículas de látex a 1910xg por 20 minutos. Se aspiró el sobrenadante y se lavó 2 veces el paquete de partículas de látex con Buffer Salino de Glicina. Finalmente, se resuspendieron las partículas de látex en una quinta parte del volumen original.

**CONCENTRACION DE
MANANAS**

PARTICULAS DE LATEX RECUBIERTAS.

DILUCIONES DE SUERO EMPLEADAS

Conc. 1:2 1:4 1:8 1:16 1:32

40 ug/ml

35 ug/ml

30 ug/ml

25 ug/ml

20 ug/ml

15 ug/ml

10 ug/ml

5 ug/ml

| | | | | | |
|--|--|--|--|--|--|
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

Cuadro 1. TITULACION EN CUADRICULA.

Para la preparación de partículas de látex testigo negativo se siguió el mismo procedimiento, sin embargo, para su recubrimiento se utilizó suero de conejo hiperinmune contra Dermatophilus congolensis el cual es un microorganismo no relacionado con Candida albicans. El suero hiperinmune contra Dermatophilus congolensis fue una donación del laboratorio de Micología de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.UNAM. Con este testigo, nos aseguramos que la técnica empleada para el recubrimiento de las partículas de látex funcione, y que las partículas de látex estén sensibilizadas.

3.6 Prueba de aglutinación con partículas de látex.

Para la prueba de aglutinación con partículas de látex se prepararon diferentes diluciones de mananas: 1,2,3,4,5,10,15,20,25,30,35 y 40 $\mu\text{g/ml}$ para determinar la mínima concentración de mananas detectadas por este método. En cada corrida se utilizó como testigo positivo las partículas de látex provistas en un estuche comercial, Candida Latex Test (DIFCO), y como testigo negativo, tanto las partículas de látex preparadas en el laboratorio con suero hiperinmune contra Dermatophilus congolensis como las partículas de látex testigo provistas en el estuche comercial.

La prueba de aglutinación se realizó en una placa de vidrio con cuadrícula de 2 x 2 cm, cada lado de la cuadrícula se marco con cera para evitar que se escurra el líquido al agitarse.

Se colocaron 30 μl de solución de mananas en cada cuadrícula de la placa. Se agregaron 30 μl de partículas de látex recubiertas con suero antimanas y se mezcló perfectamente con un aplicador de

madera. Se colocó la placa en una cámara húmeda y se agitó por espacio de 10 minutos a 100 r.p.m. aproximadamente. A los 10 minutos, se procedió a la lectura (30). Se sostuvo la placa con ambas manos a unos 20 cm de los ojos y se lee a contraluz. La forma de evaluar la aglutinación es la siguiente: - , + , ++ , +++ , según el grado de aglutinación observado a simple vista (28). Este mismo procedimiento se siguió para probar las partículas de látex recubiertas con IgG.

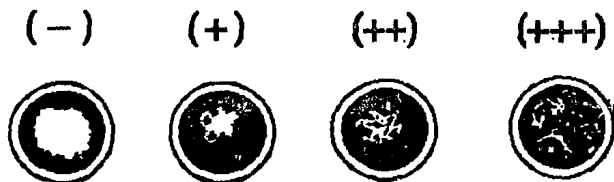


Figura 4. Grado de aglutinación en placa.

3.7 Pruebas Cruzadas.

Esta reportado en la literatura (5,7) que Candida albicans llega a presentar cruce antigénico entre sus dos serotipos A y B, así como entre algunos microorganismos del mismo genero, por ejemplo: Candida tropicalis, por lo tanto no se pensó necesario hacer una prueba cruzada con otras especies de Candidas (para poder diferenciar entre Candida albicans y otros microorganismos del mismo género existen otras pruebas auxiliares).

Para asegurarnos de la especificidad de la prueba de aglutinación, se realizó una prueba cruzada con Cryptococcus neoformans el cual es un organismo levaduriforme de importancia clínica en el humano y que pudiera presentar cruce antigénico con Candida albicans debido a su parecido estructural.

La prueba consistió en lo siguiente: Se mezcló 30 µl se suspensión de células completas de Cryptococcus neoformans al 2 % (vol/vol) (2×10^8 células/ml aproximadamente) con 30 µl de partículas de látex sensibilizadas con suero antimananas y se mezcló perfectamente con un aplicador de madera, a continuación se siguió el mismo procedimiento descrito para la prueba de aglutinación

de la solución de mananas. Se utilizó una suspensión de células completas de Candida albicans al 2 % (vol/vol) como testigo positivo y una suspensión de células completas de Dermatophillus congolensis a la misma concentración como testigo negativo. También se efectuó la prueba con diluciones dobles de la suspensión de células completas de Cryptococcus neoformans al 2 % (vol/vol).

4.0 RESULTADOS

A) Cuantificación de mananas.

Cuadro 2. Valoración de la calidad de las mananas por medio de una determinación de la concentración de carbohidratos siguiendo la técnica de fenol/ácido sulfúrico (16,29). Resultados de la curva patrón y representación gráfica en Figura 4.

| TUBO | CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS | ABSORBANCIA |
|------|--------------------------------|-------------|
| 01 | 0.05 mg/ml | 0.48 |
| 02 | 0.10 mg/ml | 0.66 |
| 03 | 0.15 mg/ml | 0.85 |
| 04 | 0.20 mg/ml | 1.00 |
| 05 | 0.25 mg/ml | 1.10 |
| 06 | 0.30 mg/ml | 1.30 |
| 07 | 0.35 mg/ml | 1.40 |
| Pba. | ? | 0.48 |

$$y = a + bx$$

$$y = 0.357 + 3.064x$$

Concentración del problema: 40.093 $\mu\text{g/ml}$

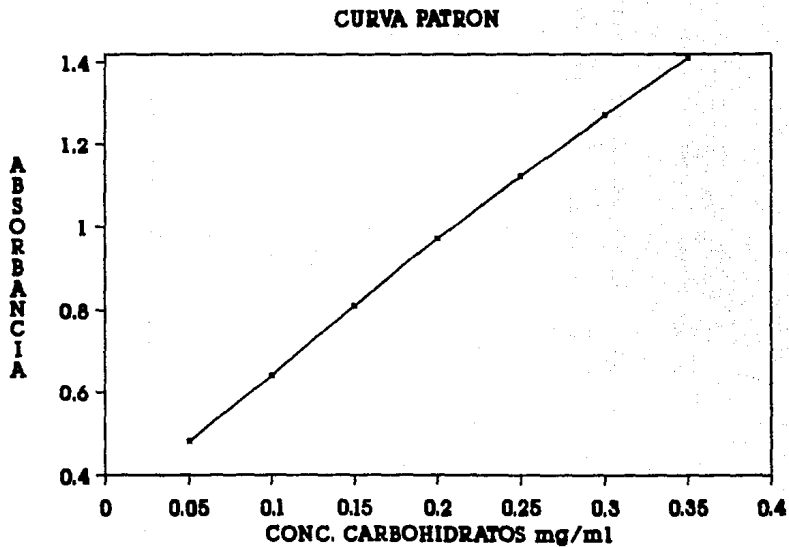
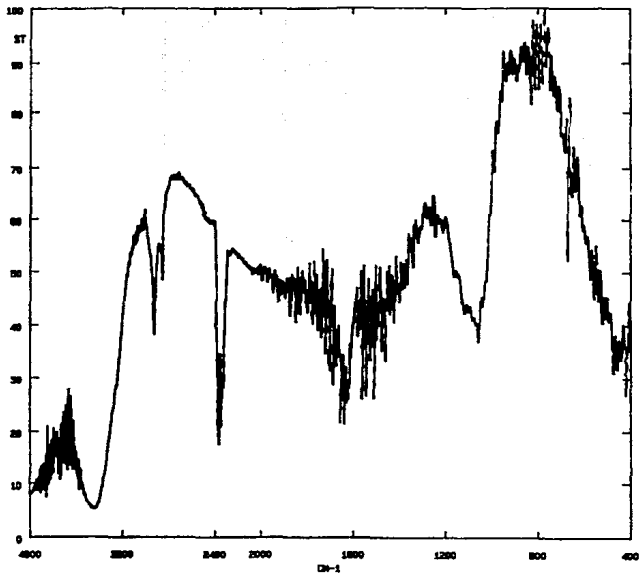
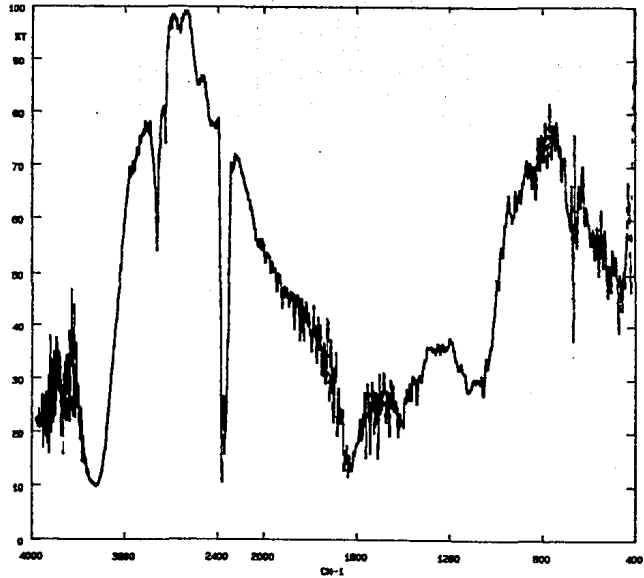


Figura 5. DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS
TECNICA DE FENOL/ACIDO SULFURICO



**Figura 6.ESPECTRO DE INFRARROJO
MANANAS ESTANDAR**



**Figura 7. ESPECTRO DE INFRARROJO
MANANÁS EXTRAIDAS**

B) Producción de Anticuerpos.

Cuadro 3. Resultados de la titulación de los niveles de anticuerpos del suero hiperinmune y de la solución de IgG.

| PRUEBA | TÉCNICA | ANTÍGENO | TÍTULO |
|-------------------|-----------------------|--|--------|
| Suero hiperinmune | Inmunodifusión doble | Mananas solubles | 1:16 |
| Suero hiperinmune | Inmunodifusión doble | Sonicado de células completas | 1:8 |
| Suero hiperinmune | Aglutinación en placa | Células completas de <u>Candida albicans</u> | 1:1024 |
| Solución de IgG | Aglutinación en placa | Células completas de <u>Candida albicans</u> | 1:128 |

PARTICULAS DE LATEX RECUBIERTAS.
DILUCIONES DE SUERO EMPLEADAS

| CONCENTRACION DE MANANAS | Conc. | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 |
|---------------------------------|--------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|
| 40 ug/ml | +++ | +++ | + | - | - | - |
| 35 ug/ml | +++ | +++ | + | - | - | - |
| 30 ug/ml | +++ | ++ | - | - | - | - |
| 25 ug/ml | +++ | ++ | - | - | - | - |
| 20 ug/ml | +++ | ++ | - | - | - | - |
| 15 ug/ml | ++ | + | - | - | - | - |
| 10 ug/ml | + | - | - | - | - | - |
| 5 ug/ml | - | - | - | - | - | - |

Cuadro 4. TITULACION EN CUADRICULA.

PARTICULAS DE LATEX RECUBIERTAS.
DILUCIONES DE IgG EMPLEADAS

| CONCENTRACION DE MANANAS | Conc. | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 |
|-----------------------------|-------|-----|-----|-----|------|------|
| 40 ug/ml | ++ | - | - | - | - | - |
| 35 ug/ml | + | - | - | - | - | - |
| 30 ug/ml | - | - | - | - | - | - |
| 25 ug/ml | - | - | - | - | - | - |
| 20 ug/ml | - | - | - | - | - | - |
| 15 ug/ml | - | - | - | - | - | - |
| 10 ug/ml | - | - | - | - | - | - |
| 5 ug/ml | - | - | - | - | - | - |

Cuadro 5. TITULACION EN CUADRICULA.

| CONCENTRACION DE MANANAS | PARTICULAS DE LATEX RECUBIERTAS. DILUCIONES DE SUERO TESTIGO NEGATIVO | | | | | |
|-----------------------------|--|-----|-----|-----|------|------|
| | Conc. | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 |
| 40 ug/ml | - | - | - | - | - | - |
| 35 ug/ml | - | - | - | - | - | - |
| 30 ug/ml | - | - | - | - | - | - |
| 25 ug/ml | - | - | - | - | - | - |
| 20 ug/ml | - | - | - | - | - | - |
| 15 ug/ml | - | - | - | - | - | - |
| 10 ug/ml | - | - | - | - | - | - |
| 5 ug/ml | - | - | - | - | - | - |

Cuadro 6. TITULACION EN CUADRICULA.

Cuadro 7. Resultados de la prueba de aglutinación en placa con partículas de látex

| NÚMERO | CONC. MANANAS µg/ml | CONTROL + | CONTROL - | LÁTEX/SUERO | LÁTEX/IgG |
|--------|------------------------|-----------|-----------|-------------|-----------|
| 01 | 40 | +++ | - | +++ | + |
| 02 | 35 | +++ | - | +++ | - |
| 03 | 30 | +++ | - | +++ | - |
| 04 | 25 | +++ | - | ++ | - |
| 05 | 20 | +++ | - | ++ | - |
| 06 | 15 | +++ | - | + | - |
| 07 | 10 | +++ | - | - | - |
| 08 | 05 | +++ | - | - | - |
| 09 | 04 | +++ | - | - | - |
| 10 | 03 | ++ | - | - | - |
| 11 | 02 | ++ | - | - | - |
| 12 | 01 | + | - | - | - |
| 13 | 0.5 | + | - | - | - |
| ..14 | 0.1 | + | - | - | - |
| Bco. | 0.0 | - | - | - | - |

Cuadro 8. Resultados de las pruebas cruzadas.

| | Susp 2% | Dil. 1:2 | Dil. 1:4 | Dil. 1:16 | Dil. 1:32 | Dil. 1:64 | Dil. 1:128 | Dil. 1:256 | Dil. 1:512 |
|-------------------------------|------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| <i>Candida albicans</i> | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ | + | - |
| <i>Dermatop. congolensis</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Cryptococc. neoformans</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

5.0 DISCUSIÓN

Como se muestra en los resultados (Cuadro 2 y Figura 5), la concentración de carbohidratos que se obtuvo al valorar las mananas extraídas es de 40.09 $\mu\text{g/ml}$; lo cual nos demuestra un buen rendimiento de la técnica de extracción empleada (52) en comparación con los datos mostrados por Torosantucci y col. (51), según la cual los valores de carbohidratos obtenidos en sus extracciones de mananas son de: 4 - 50 $\mu\text{g/mg}$ de peso seco.

Aunque existen otras variaciones a la técnica de Peat (46,51) que pudiesen presentar mayores rendimientos, la técnica empleada en el presente trabajo es adecuada a nuestra necesidad y capacidad ya que es sencilla y rápida en su elaboración. Además, debido a que los instrumentos y materiales necesarios para su realización se encuentran en el laboratorio resulta una técnica más económica.

Por otra parte, basandonos en los resultados mostrados en el análisis de espectro de infrarrojo, se puede agregar que las mananas extraídas de Candida albicans son de una calidad y pureza similares a las de un estándar comercial (SIGMA M-3640). Ya que el espectro de infrarrojo es uno de los análisis realizados en una sustancia que mayor información puede dar de la naturaleza de la misma; es por eso que en algunas ocasiones se llega a nombrar a la región del espectro infrarrojo como región dactiloscópica. Y es que dos sustancias que presentan espectros de infrarrojo tan similares como los que se muestran en las Figuras 6 y 7 son de hecho idénticas en miles de propiedades físicas, por lo que ciertamente deben de tratarse del

mismo compuesto (37).

Debido a que el antígeno que se pretendía detectar era la manana soluble de la pared de Candida albicans, se decidió seguir el protocolo de inoculación descrito por Bailey y col. (4) porque con este método nos aseguramos que los anticuerpos obtenidos serían dirigidos contra el antígeno deseado. Según reportes de la literatura (5) la forma en que se producen los anticuerpos en el conejo determina significativamente su reactividad. Cuando se inyecta al conejo con múltiples inyecciones intravenosas de células completas de Candida albicans muerta, se producen preferentemente anticuerpos contra las mananas, en cambio, si se utilizan inyecciones múltiples intramusculares o subcutáneas de células completas de Candida albicans o de su citoplasma, con o sin adyuvante de Freund, se obtienen anticuerpos contra un antígeno proteico, que reaccionan muy debilmente o incluso no reaccionan con mananas.

Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en la producción de anticuerpos (Cuadro 3), en donde la prueba de inmunodifusión doble, dió títulos de 1:16 y 1:8, mientras que en la prueba de aglutinación en placa con células completas se lograron obtener títulos de 1:128 y 1:1024, sobre todo cuando se utilizó el suero hiperinmune sin precipitar (1:1024). Al precipitar el suero y separar la fracción γ globulínica, se perdió sensibilidad, lo cual nos indica que, o bien hubo una pérdida de inmunoglobulinas durante el proceso de precipitación (bajo rendimiento de la técnica) o la fracción globulínica separada no es la que determina la respuesta inmunológica. Nosotros pensamos que es debido a esta última opción,

ya que el antígeno seleccionado (mananas) es un carbohidrato que pertenece al grupo de antígenos timo independiente, los cuales provocan una respuesta de anticuerpos por IgM principalmente.

Según reportan Khan y Jones (30), la sensibilización de partículas de látex puede hacerse con el suero hiperinmune completo o con la fracción globulínica del mismo, aunque se presenta mejor sensibilización de partículas al utilizar el suero sin precipitar. Por lo anterior se decidió probar ambas formas de recubrir partículas de látex y los resultados obtenidos, que se muestran en los Cuadros 4 y 5, concuerdan con los reportados por estos investigadores (30), es decir, la sensibilidad de las partículas de látex recubiertas con IgG anti-Candida albicans es menor que la sensibilidad de las partículas recubiertas con suero hiperinmune completo, lo cual se debe, como se menciona anteriormente, a que se utiliza un antígeno timo independiente el cual provoca una respuesta inmunológica por anticuepos IgM principalmente, los cuales se pierden en el proceso de precipitación del suero quedando únicamente anticuerpos IgG en la solución.

Los antígenos timo independientes son aquellos ante los cuales la producción de anticuerpos no requiere la ayuda de las células T. Esta es el caso de los polisacáridos como los lipopolisacáridos de las endotoxinas, los lipopolisacáridos de los neumococos y las mananas de la pared celular de Candida albicans. Desde el punto de vista químico, los antígenos timo independientes se caracterizan por la naturaleza repetitiva de sus epítopes y por su lenta degradación (3). Otra ventaja presente al sensibilizar las partículas de látex con el

suero completo es que de esta forma se evita la autoaglutinación de las partículas. Según señalan estos investigadores, las partículas de latex sensibilizadas con las γ globulinas tienden a autoaglutinar después de 72 horas de almacenamiento; por lo que recomiendan preparar una solución de IgG en un Buffer Salino de Glicina al que se le adiciona albúmina sérica bovina al 1% para evitar el problema, pero sí se recubren las partículas de látex con suero sin precipitar no se hace necesario agregar albúmina. Al parecer, la función que desempeña la albúmina es la de recubrir los espacios vacíos en las partículas de látex sensibilizadas y debido a que es una de las proteínas más catiónicas evita la interacción entre las partículas de látex y así previene la autoaglutinación.

En las titulaciones en cuadrícula se seleccionó aquella dilución de suero que al recubrir las partículas de látex resultaran en las de mayor sensibilidad. Según se muestra en el Cuadro 4, la dilución de suero completo seleccionada fué la de 1:2, ya que con esta dilución se alcanza a detectar la cantidad de 15 $\mu\text{g/ml}$ de mananas solubles. En el Cuadro 5, se ve la titulación en cuadrícula de las partículas de látex recubiertas con la IgG del antisuero contra Candida albicans y la dilución seleccionada es la concentrada, es decir, la solución de IgG concentrada fué elegida para la sensibilización de partículas de látex ya que a esta dilución se logró detectar la cantidad de 35 $\mu\text{g/ml}$.

Una razón que puede explicar la diferencia de sensibilidad presente entre las partículas de látex sensibilizadas con suero completo y con la fracción globulínica es que en las primeras se llegan a recubrir

con otro tipo de inmunoglobulinas (IgM) que son las responsables principales de la respuesta inmunológica contra las mananas, mientras que las segundas solamente están recubiertas por un tipo de inmunoglobulinas (IgG) las cuales no son liberadas en concentraciones significativas en la respuesta al antígeno seleccionado.

Con lo que respecta a las partículas de látex testigo negativo preparadas en el laboratorio con suero hiperinmune contra Dermatophillus congolensis, su eficiencia se comprobó al enfrentárlas a diferentes diluciones de mananas, y según datos mostrados en el Cuadro 6 se puede observar que no aglutinan a ninguna concentración de mananas pero sí aglutinan a células de Dermatophillus congolensis por lo que se pueden usar como testigo negativo; además de este testigo, se utilizó el testigo negativo provisto en el estuche Candida Latex Test (DIFCO). En ninguno de los dos testigos negativos se presentó aglutinación, ya fuera al enfrentarlos a soluciones de mananas o a células completas de Candida albicans.

Los resultados mostrados en el Cuadro 7 en la prueba de aglutinación con partículas de látex preparadas con suero hiperinmune sin precipitar muestran que la concentración mínima detectada por esta prueba es de 15 $\mu\text{g/ml}$ de manana en solución Buffer, mientras que las partículas testigo positivo del estuche Candida Latex Test (DIFCO) alcanzan a detectar la cantidad de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ de mananas en Buffer. Esta diferencia es notable, sin embargo es importante señalar que las partículas de látex control positivo del estuche comercial presentaban una mayor densidad óptica que las partículas preparadas en el laboratorio; las partículas del estuche comercial presentaban

una Densidad Óptica mayor a 2.0 y las partículas de látex una Densidad Óptica de 0.9. Probablemente la diferencia en sensibilidad se debe a esta diferencia en concentración entre ambas partículas de látex. Además, desconocemos el protocolo de inoculación empleado para la obtención de los anticuerpos anti-Candida albicans, el antígeno utilizado en esta inoculación, el método de fraccionamiento de las inmunoglobulinas y la técnica de sensibilización de las partículas de látex.

Por lo anterior, no es posible comparar la diferencia de sensibilidad presentada por las partículas de látex preparadas en el laboratorio y las del estuche comercial. Unicamente nos señala la posibilidad de modificar las condiciones de preparación para lograr una mayor sensibilidad. Con lo que respecta a la especificidad de la prueba, los resultados mostrados en el Cuadro 8 nos indican que no existen reacciones cruzadas al enfretar las partículas de látex sensibilizadas con Candida albicans y Cryptococcus neoformans, el cual sería el microorganismo más relacionado que pudiese tener importancia clínica en el humano; lo anterior concuerda con lo reportado en la literatura (13,19). Por lo tanto la especificidad de la prueba es adecuada para el diagnóstico de infección por Candida.

Pensamos que esta técnica cumple las necesidades de un laboratorio de diagnóstico de rutina dados los materiales y equipos en ellos presentes. Se lograría mejorar la sensibilidad diagnóstica empleando métodos y aparatos más complejos.

Los métodos de diagnóstico de infecciones sistémicas causadas por Candida albicans más recientes siguen enfocando su atención en la

aglutinación de partículas de látex, sin embargo, se realizan estudios para mejorar la sensibilidad de la misma. Para lograr tal objetivo se está analizando la posibilidad de emplear un antígeno tmo dependiente, como es una proteína de 47 kDa somática, para desarrollar una nueva generación de pruebas serodiagnósticas que prometen ser más sensibles que las disponibles en la actualidad (53). Se requiere la validación de la prueba empleando sueros de casos clínicos de positivos a Candida albicans.

6.0 CONCLUSIONES.

El método de aglutinación con partículas de látex puede representar una alternativa para el diagnóstico de infecciones causadas por Candida albicans. En general, esta prueba cumple con las necesidades de un laboratorio de diagnóstico micológico. Y puede ser utilizada como una herramienta en el diagnóstico de infecciones sistémicas causadas por Candida albicans junto con otros métodos, para así lograr un diagnóstico certero y temprano de la infección.

APENDICE 1

Cuantificación de carbohidratos por el método de Dubois. (16,29)

Con este método se cuantifican azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados con grupos reductores libres o potencialmente libres. Es ventajoso ya que no se requiere de hidrólisis previa. Sin embargo, no es aplicable con aminoazúcares, derivados alcohólicos y no es suficientemente sensible con pentosas. El método es utilizado particularmente para la estimación de azúcares separados por cromatografía en papel.

REACTIVOS.

- 1.- 5.5ml de fenol líquido (90%) + 94.5ml de agua destilada.
(Concentración final de 5%).
- 2.- Ácido sulfúrico concentrado.
- 3.- Glucosa y Manosa. 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Lineal 1-5 μl .

METODO.

- 1.- 200 μl de la muestra.
- 2.- 200 μl de reactivo de fenol (1)
- 3.- Rápida y cuidadosamente agregar 1 ml de H_2SO_4 conc. Agitar.
- 4.- Mantener a temperatura ambiente 10 minutos.
- 5.- Incubar a 30°C por 20 minutos.

- 6.- Leer a 490 nm (El color es estable de 2 a 3 horas a temperatura ambiente).

APÉNDICE 2

Método de Doble inmunodifusión. (47)

REACTIVOS.

- 1.- Buffer Salino de Fosfatos.

| | |
|--|------------|
| Cloruro de sodio (NaCl) | 8.00 g |
| Hidrógeno de fosfato dipotásico (K_2HPO_4) | 1.21 g |
| Dihidrógeno de fosfato potásico (KH_2PO_4) | 0.34 g |
| Agua deionizada | 1000.00 ml |

Los ingredientes son suspendidos en el agua y se mezclan hasta su total disolución. pH 7.2

- 2.- Buffer Veronal (Barbitone).

| | |
|-----------------------------------|------------|
| Ac. dietilbarbitúrico (Barbitone) | 3.32 g |
| Dietil barbitone de sodio | 25.52 g |
| Azida de sodio (NaN_3) | 2.00 g |
| Agua deionizada | 2000.00 ml |

El barbitone se disuelve en 200 ml de agua deionizada caliente, el barbital de sodio se disuelve en la solución y se adiciona el agua restante hasta completar los 2000 ml. El azida de sodio se adiciona como preservativo.

- 3.- Solución para decolorar.

| | |
|-----------------------|-----------|
| Metanol | 500.00 ml |
| Ácido acético glacial | 100.00 ml |
| Agua deionizada | 400.00 ml |

- 4.- Solución Negro de Amido.

| | |
|----------------------------|------------|
| Negro de Amido (naftaleno) | 1.00 g |
| Solución para decolorar | 1000.00 ml |

Los ingredientes se mezclan y se guardan en un frasco color ámbar.

METODO.

- 1.- Disolver 1.5 g de agar purificado en 50 ml de agua destilada, añadir 50 ml de buffer de Veronal caliente (56°C) con azida de sodio ya incorporada al buffer.
- 2.- Vaciar en cajas Petri grandes (8.5 cm) 10 ml del medio para cada caja, utilizando una mesa o tabla nivel.
- 3.- Dejar solidificar para que el agar quede firme, se puede refrigerar por espacio de 5 minutos a 4°C aproximadamente.
- 4.- Por cada caja tener 3 patrones y hacer los pozos con oradorador.
- 5.- Los patrones se marcan con azul de alsacia.
- 6.- Los orificios hechos en el agar se llenan con el antígeno en el centro y los antisueros alrededor o viceversa. Se recomienda anotar en un papel el esquema seguido.
- 7.- Las cajas se colocan en una cámara húmeda y se incuban a 37°C por 24 horas para lograr las líneas de precipitación.
- 8.- Después de las 24 horas, las placas se retiran de la caja Petri y se dejan remojando en el Buffer Salino de Fosfatos por espacio de 24 horas.
- 9.- A las 24 horas, la solución se cambia por Buffer Salino de Fosfatos limpio o nuevo.
- 10.- A las 24 horas, el Buffer Salino de Fosfatos se cambia por agua destilada y las placas se dejan aquí por 24 horas.
- 11.- Por último se colocan las placas en planchas de vidrio y se

dejan en una estufa para secar. Se tñen con solución de Negro de Amido.

APÉNDICE 3

Precipitación de antisuero de mamífero con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (22)

La composición proteica de los antisueros de conejo, caballo, cabra y oveja son característicamente diferentes. Por lo tanto, la cantidad y tipo de proteínas séricas precipitadas por una concentración dada de sulfato de amonio varía de acuerdo con las especies animales de las que se obtiene el suero. Las fracciones de globulina cruda mostradas en la figura 2 fueron obtenidas de estos cuatro antisueros de mamífero por medio de los siguientes procedimientos y son de una pureza adecuada para la producción de conjugados satisfactorios para diferentes aplicaciones.

REACTIVOS.

1.- Sulfato de amonio grado reactivo . $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

a) Solución stock saturada (pH 5.8)

Colocar 55 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ puro en un matraz volumétrico de 100 ml y llevar a aforo con agua destilada. Conservar a temperatura ambiente, se puede conservar por varios días antes de usarse, agitar perfectamente al menos una vez al día.

b) Soluciones de trabajo (pH 5.8)

Preparar solución nueva según se necesite como se muestra en la siguiente tabla.

| SOL. STOCK VOL. | AGUA DEST. VOL. | SOLN. TRABAJO x SATURACION | MEZCLA REACC. PROT. x SATURACION |
|--------------------|--------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| 10 | 0 | 100 | 50 |
| 9 | 1 | 90 | 45 |
| 8 | 2 | 80 | 40 |
| 7 | 3 | 70 | 35 |
| 6 | 4 | 60 | 30 |

2.- Cloruro de sodio NaCl 0.85%

Colocar 8.5 g de NaCl en un matraz volumétrico de 1 litro. Disolver y aforar con agua destilada. Elevar el pH aproximadamente a 8.0 con NaOH.

METODO.

Precipitación de antisuero de oveja y conejo con sulfato de amonio. Con antisuero de conejo, este procedimiento ha dado productos que tienen aproximadamente 65% de gamma globulina, 34% de otras globulinas, y 1% de albúmina.

1.- Mientras se agita suavemente el suero, agregar lentamente un volumen de solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (al 70% de saturación) igual al volumen del suero; por ejemplo, para 10 ml de suero agregar 10 ml de solución. Mezclar perfectamente y dejar reposar.

NOTA: VOLUMENES IGUALES DE SUERO Y DE UNA SOLUCION SATURADA AL 70% RESULTAN EN LA PRECIPITACION DE LAS GLOBULINAS EN LA PRESENCIA DE UNA SOLUCION SATURADA AL 35%.

2.- Dejar que se realice la reacción a 25°C por un mínimo de 4 horas o a 4°C por un mínimo de 24 horas. Después, concentrar el precipitado globulínico por centrifugación a 4°C por 30 minutos a una fuerza centrífuga relativa de aproximadamente 1440 x g.

Decantar y desechar el líquido sobrenadante.

- 3.- Agregar agua destilada al precipitado, agitar suavemente durante la adición para obtener una solución globulínica que tenga un volumen total aproximado al del suero original. (10 ml).
- 4.- Reprecipitar la globulina como se describe en el paso 1, empleando un volumen de solución de sulfato de amonio (al 70% de saturación) igual al volumen de la solución globulínica. Centrifugar inmediatamente como antes, desechar el sobrenadante y resuspenda como en el paso 3. Precipitar la globulina una vez más y resuspenda como en el paso 3 o a un volumen menor si se desea concentrar.
- 5.- Dializar la globulina contra cambios frecuentes de solución de NaCl 0.85% pH 8.0 hasta que no se detecte sulfato en el dializado después de su uso por 24 horas. La presencia de sulfato de amonio es determinada por la adición de un pequeño volumen de solución saturada de cloruro de bario ($BaCl_2$) igual al volumen de dializado salino. Mezclar perfectamente, si no se forma ninguna nubosidad, se considera que la solución globulínica está libre de sulfato de amonio.

NOTA: EL SULFATO DE AMONIO INTERVIENE EN LA DETERMINACION DE CONCENTRACION DE GLOBULINA POR LAS TECNICAS MAS COMUNEMENTE EMPLEADAS Y CUANDO EL SULFATO DE AMONIO ESTA PRESENTE EN CANTIDADES DE 0.08 M O MAYORES, INTERFIERE CON LA REACCION DE CONJUGACION. EL TIEMPO REQUERIDO PARA REMOVER EL SULFATO DE AMONIO POR DIALISIS SE DISMINUYE CON CAMBIOS FRECUENTES DE LA SOLUCION DE CLORURO DE SODIO PERO NO POR AGITACION.

7.0 REFERENCIAS

- 1.- Arnold, W.N. (1981). Yeast cell envelopes: biochemistry, biophysics, and ultrastructure. CRC Press, Boca Raton, U.S.A.
- 2.- Ashman, R.B., Papadimitriou, J.M., Ott, A.K. and Warmington, J.R. (1990). Review. Antigens and immune responses in Candida albicans infection. Immunol. Cell. Biol. 68:1-13
- 3.- Bach, J.F. (1989). Inmunología. Ediciones Ciencia y Técnica S.A. México, D.F., México.
- 4.- Bailey, J.W., Sada, E., Brass, C. and Bennett, J.E. (1985). Diagnosis of systemic candidiasis by latex agglutination for serum antigen. J. Clin. Microbiol. 21:749-752
- 5.- Bennett, J.E. (1987). Rapid diagnosis of candidiasis and aspergillosis. Rev. Infect. Dis. 2:398-402
- 6.- Bougnoux, M.E., Hill, K., Moissenet, D., De Chauvin, M.F., Bonnay, M., Vicens-Sprauel, I., Pietri, F., McNeil, M., Kaufman, L., Dupouy, J., Bohuon, C. and Andreumont, A. (1990). Comparison of antibody, antigen, and metabolite assay for hospitalized patients with disseminated or peripheral candidiasis. J. Clin. Microbiol. 28:905-909
- 7.- Brawner, D.L. (1991). Comparison between methods for serotyping of Candida albicans produces discrepancies in results. J. Clin. Microbiol. 29:1020-1025
- 8.- Brawner, D.L. and Cutler, J.E. (1989). Oral Candida albicans isolates from nonhospitalized normal carriers, immunocompetent hospitalized patients, and immunocompromised patients with or without acquired immunodeficiency syndrome. J. Clin. Microbiol. 27: 1335-1341
- 9.- Calderone, R.A. and Braun, P. (1991). Adherence and receptor relationships of Candida albicans. Microbiol. Rev. 55:1-20
- 10.- Campos, G. (1991). Candidosis vulvovaginal (Especies involucradas, correlación con signos y síntomas). Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Edo. de México.
- 11.- Casanova, M., Martínez, J.P. and Chaffin, W.L. (1991). Identification of germ tube cell wall antigens of Candida albicans. J. Med. Vet. Mycol. 29:269-272

- 12.- Cole,G.T., Lynn,K.T., Seshan,K.R. and Pope,L.M. (1989). Gastrointestinal and systemic candidosis in immunocompromised mice. J. Med. Vet. Mycol. 27:363-380
- 13.- Cutler,J.E. (1991). Putative virulence factors of Candida albicans. Annu. Rev. Microbiol. 45: 187-218
- 14.- Dealler,S.F. (1991). Candida albicans colony identification in 5 minutes in a general microbiology laboratory. J. Clin. Microbiol. 29:1081-1082
- 15.- Doskeland,S.D. and Berdal,B.P. (1980). Bacterial antigen detection in body fluids: methods for rapid antigen concentration and reduction of non-specific reactions. J. Clin. Microbiol. 11:380-384
- 16.- Dubois,M. Gilles,K.A., Hamilton,J.K. and Robers,P.A. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28:350
- 17.- Franklyn,K.M., Warmington,J.R., Ott,A.K. and Ashman,R.B. (1990). An immunodominant antigen of Candida albicans shows homology to the enzyme enolase. Immunol. Cell. Biol. 68:173-178
- 18.- Fung,J.C., Donta,S.T. and Tilton,R.C. (1986). Candida detection system (CAN-TEC) to differentiate between Candida albicans colonization and disease. J. Clin. Microbiol. 24:542-547
- 19.- Gil,M.L., Casanova,M., Martínez,J.P. and Sentandreu,R. (1991).Antigenic cell wall mannoproteins in Candida albicans isolates and in other Candida species. J. General Microbiol. 137:1053-1061
- 20.- Goldschmidt,M.C., Fung,D.Y.C., Grant,R., White,J. and Brown,T. (1991). New aniline blue dye medium for rapid identification and isolation of Candida albicans. J. Clin. Microbiol. 29:1095-1099
- 21.- Greenfield,R.A. (1992). Host defense system interactions with Candida. J. Med. Vet. Mycol. 30:89-104
- 22.- Hebert,G.A., Pittman,B., McKinney,R.M. and Cherry, W.B. (1972). The preparation and physicochemical characterization of fluorescent antibody reagents. U.S. Department of Health, Education and Welfare. Public Health Service.
- 23.- Homma,M., Kanbe,T., Chibana,H. and Tanaka,K. (1992). Detection of intracellular forms of secretory aspartic proteinase in Candida albicans. J. General Microbiol. 138:627-633

- 24.- Horn,R., Wong,B. and Kiehn,T.E. (1985). Fungemia in a cancer hospital: Changing frequency, earlier onset, and results of therapy. Rev. Infect. Dis. 7:646-655
- 25.- Howard,D.H. (1983). Fungi pathogenic for humans and animals. Marcel Dekker Inc. U.S.A.
- 26.- Huahua,T., Rudy,J. and Kunin,C.M. (1991). Effect of hydrogen peroxide on growth of Candida, Cryptococcus, and other yeasts in simulated blood culture bottles. J. Clin. Microbiol. 29:328-332
- 27.- Ishiguro,A., Homma,M., Torii,S. and Tanaka,K. (1992). Identification of Candida albicans antigens reactive with immunoglobulin E antibody of human sera. Infect. Immun. 60:1550-1557
- 28.- Kabasawa,K., Itagaki,H., Ikeda,R., Shinoda,T., Kagaya,K. and Furazawa,Y. (1991). Evaluation of a new method for identification of Cryptococcus neoformans wich uses serologic test aided by selected biological tests. J. Clin. Microbiol. 29:2873-2876
- 29.- Koletti,G. and Lederer,W.H. (1974) Handbook of micromethods for the biological sciences. Van Nostrand. U.S.A.
- 30.- Khan,F.W. and Jones,J.M. (1986). Latex agglutination tests for detection of Candida antigens in sera of patients with invasive candidiasis. J. Infect. Dis. 153:579-585
- 31.- Krivoshein,Y. (1989). Manual práctico de microbiología médica y diagnóstico de laboratorio de laboratorio de las enfermedades infecciosas. Editorial Mir. Moscú, U.R.S.S.
- 32.- Kwong-Chung,K.J., Lehmann,D., Good,C., and Magee,P.T. (1985). Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of Candida albicans. Infect. Immun. 49:571-575
- 33.- Lemieux,C., St-Germain,G., Vincelette,J., Kaufman,L., Repentigny,L. (1990). Collaborative evaluation of antigen detection by a commercial latex agglutination test and enzyme immunoassay in the diagnosis of invasive candidiasis. J. Clin. Microbiol. 28: 249-253
- 34.- Li,R.K. and Cutler,J.E. (1991). A cell surface/plasma membrane antigen of Candida albicans. J. General microbiol. 137:455-464
- 35.- Manning-Zweerink,M., Maloney,C.S., Mitchell,T.G. and Weston,H. (1986). Immunoblot analyses of Candida albicans-associated antigens and antibodies in human sera. J. Clin. Microbiol. 23:46-52
- 36.- Martínez,J.P., Gil,M.L., Casanova,M., Lopez-Ribot,J.L., García de Lomas,J. and Sentandreu,R. (1990). Wall manoproteins in cells from colonial phenotypic variants of Candida albicans. J. General

Microbiol. 136:2421-2432

- 37.- Morrison, R.T. and Boyd, R.N. (1987). Química Orgánica. Cuarta ed. Addison-Wesley Iberoamericana. México, D.F., México.
- 38.- Nakamura, A., Ishikawa, N. and Suzuki, H. (1991). Diagnosis of invasive candidiasis by detection of mannan antigen by using the avidin-biotin enzyme immunoassay. J. Clin. Microbiol. 29:2363-2367
- 39.- Odds, F.C. (1979). Candida and candidosis. Park Press. Baltimore, U.S.A.
- 40.- Phillips, P., Dowd, A., Jewesson, P., Radigan, G., Tweeddale, M.G., Clarke, A., Gere, I. and Kelly, M. (1990). Nonvalue of antigenic detection immunoassays for diagnosis of candidemia. J. Clin. Microbiol. 28:2320-2326
- 41.- Pike, W.J., Clarke, J., Lacey, J.C.N., Hunter, P.A. and Evans, G.V. (1991). Candida cell wall mannan in the vagina and its association with the signs and symptoms of vaginal candidosis. J. Med. Vet. Mycol. 29:305-312
- 42.- Pike, I.H., Evans, G.V. and Carney, J.A. (1991). Mannan estimation as a measure of the growth of Candida albicans. J. Med. Vet. Mycol. 29:83-91
- 43.- Reiss, E., Stone, S.H. and Hasenclever, H.F. (1974). Serological and cellular immune activity of peptidoglucomannan fractions of Candida albicans cell walls. Infect. Immunity. 9:881-890
- 44.- Repentigny-De, L., Marr, L.D., Keller, J.W., Carter, A.W., Kaufman, L., Kuykendall, R.J. and Reiss, E. (1985). Comparison of gas enzyme immunoassay and gas-liquid chromatography for the rapid diagnosis of invasive candidiasis in cancer patients. J. Clin. Microbiol. 21:972-979
- 45.- Sandovsky-Losica, H. and Segal, E. (1989). Interaction of Candida albicans with murine gastrointestinal mucosa: effect of irradiation on adherence in vitro. J. Med. Vet. Mycol. 27:345-352
- 46.- Saxena, A., McElhaney-Feser, G.E. and Cihlar, R.L. (1990). Mannan composition of the hyphal form of two relatively avirulent mutants of Candida albicans. Infect. Immun. 58:2061-2066
- 47.- Segundo, C. (1991). Manual teórico práctico de micología médica para la carrera de Q.F.B. (prácticas y alternativas). Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Edo. de México.
- 48.- Stevens, D.A., Odds, F.C. and Scherer, S. (1990). Application of DNA typing methods to Candida albicans epidemiology and correlations with the phenotype. Rev. Infect. Dis. 12:258-266

- 49.- Takahashi,M., Banno,Y. and Nozawa,Y. (1991). Secreted Candida albicans phospholipases: purification and characterization of two forms of lysophospholipase-transacylase. J. Med. Vet. Mycol. 29:193-204
- 50.- Thomas,M. (1986). Agglutination methods for rapid analysis. Nature. 320:289-290
- 51.- Torosantucci,A., Boccanera,M., Casalinuovo,I., Pellegrini,G. and Cassone,A. (1990). Differences in the antigenic expression of immunomodulatory mannoprotein constituents on yeast and mycelial forms of Candida albicans. J. General Microbiol. 136:1421-1428
- 52.- Valdespino,A. (1988). Extracción del principal antígeno de pared celular de Candida albicans y preparación del suero hiperinmune para su diagnóstico. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Edo. de México.
- 53.- Zöller,L., Krämer,I., Kappe,R. and Sonntag,H.G. (1991). Enzyme immunoassays for invasive Candida infections: Reactivity of somatic antigens of Candida albicans. J. Clin. Microbiol. 29:1860-1867